

①⑨ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Patentschrift  
⑩ DE 40 15 851 C 1

②① Aktenzeichen: P 40 15 851.9-41  
②② Anmeldetag: 17. 5. 90  
④③ Offenlegungstag: —  
④⑤ Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 22. 8. 91

⑤① Int. Cl.<sup>5</sup>:  
**C 12 P 7/44**  
C 12 P 7/42  
C 07 C 59/01  
C 07 C 59/245  
// (C12P 7/44, C12R  
1:73, 1:74, 1:84, 1:85)  
(C12P 7/42, C12R  
1:73, 1:74, 1:84,  
1:85) B01F 17/00,  
17/56, C08G 63/06,  
C10M 129/44

DE 40 15 851 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦③ Patentinhaber:  
Henkel KGaA, 4000 Düsseldorf, DE

⑦② Erfinder:  
Eierdanz, Horst, Dr., 4010 Hilden, DE; Lorenz, Peter,  
Dr., 4018 Langenfeld, DE; Meussdörffer, Franz, Dr.;  
Schindler, Joachim, Dr., 4010 Hilden, DE; Stoll,  
Gerhard, Dr., 4052 Korschenbroich, DE; Waldhoff,  
Heinrich, Dr., 4018 Langenfeld, DE

⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit  
in Betracht gezogene Druckschriften:  
Biotechnology, Vol. 6a, Kapitel 9, S. 329 ff, 1984,  
Verlag Chemie, Weinheim;

⑤④ Verfahren zur Herstellung verzweigter Carboxylverbindungen

⑤⑦ Ein Verfahren zur Umwandlung von Alkanen und/oder  
ihren Derivaten in Dicarbonsäuren oder Derivate mit zumin-  
dest vorwiegend gleicher Anzahl an C-Atomen, bei dem in  
Gegenwart von Hefe-Mutanten, deren  $\beta$ -Oxidationsweg un-  
terbrochen ist, gearbeitet wird, sollte zur Herstellung von  
Hydroxymonocarbonsäuren oder Hydroxydicarbonsäuren  
nutzbar gemacht werden. Dies gelang dadurch, daß man  
2-Alkylalkanoole in Hydroxymonocarbonsäuren und/oder Hy-  
droxydicarbonsäuren umwandelt.

DE 40 15 851 C 1

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren gemäß dem Oberbegriff des Anspruchs 1.

Dicarbonsäuren mit mehr als 10 C-Atomen sind nach Methoden der präparativen organischen Chemie im technischen Maßstab schwer herstellbar. Dies gilt insbesondere für Dicarbonsäuren, die außer den beiden endständigen Carboxylgruppen noch weitere funktionelle Gruppen wie Doppelbindungen oder Hydroxylgruppen aufweisen.

Man hat daher versucht, aus gut zugänglichen Rohstoffen mit Hilfe der Stoffwechselleistungen verschiedener Mikroorganismen lineare Dicarbonsäuren präparativ zu erzeugen. So wird in der deutschen Patentschrift 21 40 133 vorgeschlagen, auf Alkane, primäre Alkanole oder Carbonsäuren eine Hefe der Gattung *Candida* und *Pichia* unter Fermentationsbedingungen einwirken zu lassen. Bei Einsatz von zum Beispiel einem speziellen Stamm von *Candida lipolytica* entstehen dabei Dicarbonsäuren, deren C-Kette gegenüber dem Ausgangsmaterial nicht oder nicht wesentlich abgebaut ist und auch ansonsten keine Veränderungen wie Einführen neuer funktioneller Gruppen aufweist. Ähnliche Verfahren, bei denen spezielle andere Mikroorganismen eingesetzt werden, sind beschrieben in den US-Patenten 39 75 234 und 43 39 536, in der britischen Patentschrift 14 05 026 sowie in den deutschen Offenlegungsschriften 21 64 626, 28 53 847, 29 37 292 und 29 51 177.

Das US-Patent 44 74 882 hat ungesättigte Dicarbonsäuren zum Gegenstand. Diese werden gewonnen, indem ein Stamm der Spezies *Candida tropicalis* zur Umwandlung von ungesättigten Monocarbonsäuren mit 14 bis 22 C-Atomen eingesetzt wird. Die ungesättigten Dicarbonsäuren entsprechen in der Anzahl und Lage der Doppelbindung den Ausgangsmaterialien.

In der deutschen Offenlegungsschrift 35 40 834 wird ein Verfahren zur Umwandlung von Alkanen und/oder Monocarbonsäuren in Dicarbonsäuren angegeben, bei dem mit einer Blockmutante von *Candida lipolytica* gearbeitet wird, wobei Dicarbonsäuren entstehen, die zusätzliche Doppelbindungen aufweisen.

Ein Verfahren, bei dem keine zusätzlichen Doppelbindungen eingefügt werden, wird in der deutschen Offenlegungsschrift 37 21 119 beschrieben, die einen Mikroorganismenstamm *Candida tropicalis* betrifft, der die Fähigkeit aufweist, insbesondere Methylmyristat in Tetradeccandisäure umzuwandeln.

Schließlich beschreibt die deutsche Offenlegungsschrift 37 38 812 einen Stamm *Candida tropicalis*, der die Fähigkeit besitzt, Kettenlängen spezifisch Methyl-laurat in die entsprechende Dicarbonsäure umzusetzen.

Eine Literaturübersicht über das Gesamtgebiet findet sich bei H.J. Rehm und G. Reed (Herausgeber), *Biotechnology*, Vol. 6a, Kapitel 9, Seiten 329 ff., Verlag Chemie Weinheim 1984).

Der gesamten Vorliteratur ist nicht zu entnehmen, daß mit Hilfe von Hefe-Mutanten deren  $\beta$ -Oxidation geblockt ist, auch verzweigte Alkohole wie 2-Alkylalkanoole in entsprechende Carbonsäuren, also Hydroxymonocarbonsäuren bzw. Hydroxydicarbonsäuren, umgewandelt werden können. Derartige Hydroxymonocarbonsäuren bzw. Hydroxydicarbonsäuren stellen jedoch wertvolle Rohstoffe dar. Überdies hätte der Fachmann erwartet, daß beim Einsatz von 2-Ethylalkanolen in erster Linie die Oxidation der  $\text{CH}_2\text{—OH}$ -Gruppe zu einer Carboxylgruppe stattfindet, nicht aber, daß diese Gruppe erhalten bleibt.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren bereitzustellen, diese Verbindungen durch Fermentationen in einfacher Weise zu gewinnen.

Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren zur Umwandlung von Alkanen und/oder ihren Derivaten in Dicarbonsäuren oder Derivate mit zumindest vorwiegend gleicher Anzahl an C-Atomen in Gegenwart von Hefe-Mutanten, deren  $\beta$ -Oxidationsweg unterbrochen ist, dadurch gekennzeichnet, daß man 2-Alkylalkanoole in Hydroxymonocarbonsäuren und/oder Hydroxydicarbonsäuren umwandelt.

Bei den erfindungsgemäß als Ausgangsstoffe eingesetzten Verbindungen handelt es sich um 2-Alkylalkanoole. Bevorzugt sind solche 2-Alkylalkanoole, die durch Dimerisierung und insbesondere durch Guerbet-Reaktion aus primären linearen Alkoholen hergestellt werden können und technisch verfügbar sind. Unter diesen Verbindungen sind die durch Guerbet-Reaktion hergestellten Dimerisierungsprodukte von Fettalkoholen bzw. Fettalkoholgemischen besonders bevorzugt. Derartige aus Fettalkoholen hergestellte 2-Alkylalkanoole können auch noch Doppelbindungen enthalten.

Neben oder anstelle dieser Verbindungen können aber auch andere 2-Alkylalkanoole eingesetzt werden, insbesondere Produkte mit einer kürzeren Alkylverzweigung in 2-Stellung. Dabei hat sich im erfindungsgemäßen Verfahren herausgestellt, daß kurzkettige Alkylverzweigungen, also etwa Methyl- oder Ethylgruppen, nicht oder nur in geringem Umfang zu Carboxylgruppen oxidiert werden. Längerkettige Verzweigungen werden jedoch zu Produkten mit endständiger Carboxylgruppe umgewandelt.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens kann der Fachmann auf eine Vielzahl von bekannten Hefemutanten, bei denen der  $\beta$ -Oxidationsweg durch klassische Mutagenese oder genetische Manipulation unterbrochen ist, zurückgreifen. So sind prinzipiell eine Vielzahl von Mutanten von Stämmen einsetzbar, die den Gattungen *Candida*, *Pichia* oder *Saccharomyces* angehören.

Mit besonderem Vorteil können Mutanten von Stämmen *Candida lipolytica* oder *Candida tropicalis* eingesetzt werden. So kann beispielsweise der in der DE 35 40 834 A1 genannte Stamm DSM 3581 oder der in der DE 37 38 812 A1 genannte Stamm DSM 4277 bzw. Mutanten oder Varianten dieser Stämme mit Erfolg bevorzugt eingesetzt werden.

Das zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens eingesetzte Fermentationsmedium entspricht den für die Anzucht von *Candida*-Arten bekannten und beschriebenen Medien. Geeignete Fermentationsmedien enthalten die üblichen Spurenelemente, eine Stickstoffquelle und eine zusätzliche, mit dem zu transformierenden Substrat nicht identische Kohlenstoffquelle. Unter Spurenelementen sind hier beispielsweise Salze der Kationen, Ammonium, Kalium, Natrium, Magnesium, Calcium und Mangan mit den Anionen wie Phosphat, Sulfat, Chlorid zu verstehen. Als Stickstoffquelle können neben anorganischen Verbindungen wie zum Beispiel  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  auch Pepton oder Hefeextrakt eingesetzt werden.

Die Fermentationslösung enthält weiterhin als Kohlenstoffquelle ein Cosubstrat. Als Cosubstrat kann beispielsweise Natriumacetat eingesetzt werden. Weiterhin ist es möglich, daß als Cosubstrat übliche Zucker wie Glucose, Fructose, Maltose, Trehalose und dergleichen eingesetzt werden. Ein besonders bevorzugtes Cosubstrat ist Glycerin.

Nach einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es bevorzugt, den zur Umwandlung vorgesehenen Ausgangsverbindungen zur besseren Verteilung im Fermentationsmedium Emulgatoren zuzufügen. So werden günstige Ergebnisse erzielt, wenn insgesamt 0,1 bis 3 Gew.-%, bezogen auf Fermentationsmedium, an Emulgatoren vorhanden sind. Geeignet sind hier physiologisch verträgliche Emulgatoren und insbesondere physiologisch verträgliche nichtionische Emulgatoren. So können beispielsweise Zuckerester oder auch Sorbitanester, ethoxylierte Zuckerester, ethoxylierte Sorbitanester oder auch Alkylglycoside eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäß hergestellten Hydroxycarbonsäuren bzw. Hydroxydicarbonsäuren können als Ausgangsstoffe für die Herstellung von Polyestern oder auf dem Schmiermittelsektor Verwendung finden.

#### Beispiele

##### Medium A

"Yeast-Nitrogen-Base" Medium, pH 6,8, supplementiert mit 1,3% Glucose, 4,5% Glycerin, 0,3% Na-Acetat, 0,3% Pepton und 0,6% Hefeextrakt sowie 0,5% Transformationsedukt.

##### Medium B

0,2M Phosphatpuffer, pH 7,8 mit "Yeast nitrogen base w/o aminoacids", 0,3% ethoxylierter Sorbitanester, MYRJ52® und 3% Substrat.

##### Beispiel 1

*Candida lipolytica* DSM 3581 wurde in 100 ml YM-Nährbouillon (500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikannen) angeimpft und für 36 h bei 140 UpM geschüttelt. Aus dieser Vorkultur wurde ein Aliquot (10 ml) zur Beimpfung von 100 ml Medium A verwendet. Diese Kultur wurde 36 h bei 30°C geschüttelt. Danach wurden 50 ml der erhaltenen Zellsuspension mit 50 ml Medium B in neue, sterile 500 ml-Erlenmeyerkolben gegeben und bei 30°C geschüttelt. Als Substrate wurden entweder 2-Octyldodecanol (Eutanol®G20) oder 2-Hexyldecanol (Eutanol®G16) eingesetzt. Nach 6 h fand eine erste pH-Kontrolle statt, gleichzeitig wurden weitere 3% des Edukts und 1% Glycerin als Cosubstrat zugegeben.

Die Bildung der Produkte wurde mittels TLC verfolgt. Durch Anfärbung mit 2,7-Dichlorfluorescein und FeCl<sub>3</sub> konnten Verbindungen, die Carboxylgruppen enthalten (mithin Carbonsäuren, d. h. Produkte), selektiv visualisiert werden.

##### Beispiel 2

Eine Vorkultur einer Mutante von *Candida tropicalis* DSM 4277 wurde — wie in Beispiel 1 beschrieben — angezogen und zur Beimpfung von 500 ml Medium A im 2 l Erlenmeyerkolben verwendet. Die Kultur wurde 48 h bei 30°C geschüttelt (140 UpM) und anschließend in 100 ml Aliquots steril abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 100 ml Medium B (500 ml Erlenmeyerkolben) resuspendiert, wobei 2-Octyldodecanol (Eutanol®G20) als Substrat diente. Nach jeweils 24 h wurde der pH des Ansatzes überprüft und bei Bedarf nachgestellt und der Fortgang der Transformation durch TLC mit anschließender Anfärbung auf Carboxylgruppen überprüft. Das

Auftreten positiver Banden nach Anfärbung mit Eisenchlorid zeigte die Bildung von Carbonsäuren an. Nach 60, 80 und 161 h wurden Essigesterextrakte von Aliquots des Ansatzes mittels HPLC auf ihre Zusammensetzung hin untersucht. Neugebildete Verbindungen wurden nach der Auftrennung und Derivatisierung mittels GCMS charakterisiert. So konnte nachgewiesen werden, daß sich nach 64 h 0,8 g/l der Monohydroxysäure und 0,8 g/l der Hydroxydicarbonsäure gebildet hatten.

##### Beispiel 3

*Candida tropicalis* (aus Beispiel 2) wurde analog zu Beispiel 2 zur Transformation von Lial®123 eingesetzt. Die Analytik der Produkte erfolgte — wie in Beispiel 2 dargelegt — mit TLC, HPLC und GCMS. Nach 48 h hatten sich 0,4 g/l der C<sub>13</sub>-Hydroxymonocarbonsäure gebildet.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Umwandlung von Alkanen und/oder ihren Derivaten in Dicarbonsäuren oder Derivate mit zumindest vorwiegend gleicher Anzahl an C-Atomen in Gegenwart von Hefe-Mutanten, deren  $\beta$ -Oxidationsweg unterbrochen ist, dadurch gekennzeichnet, daß man 2-Alkylalkanoole in Hydroxymonocarbonsäuren und/oder Hydroxydicarbonsäuren umwandelt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man durch Guerbet-Reaktion hergestellte Dimerisierungsprodukte linearer primärer Alkohole mit 12 bis 40 C-Atome einsetzt.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß man durch Guerbet-Reaktion hergestellte Dimerisierungsprodukte gesättigter oder ungesättigter Fettalkohole einsetzt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man 2-Alkylalkanoole mit 12 bis 40 C-Atomen einsetzt.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man in Gegenwart einer Mutante eines Stammes aus der Gattung *Candida*, *Pichia* oder *Saccharomyces* arbeitet, bei welcher der  $\beta$ -Oxidationsweg durch klassische Mutagenese oder durch gentechnische Manipulation unterbrochen ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man in Gegenwart einer Mutante von *Candida lipolytica* oder *Candida tropicalis* arbeitet.

— Leerseite —

## TRANSLATION

(19) Federal Republic of Germany  
German Patent Office

(12) Patent (10) DE 40 15 851 C1

(51) International classification<sup>5</sup>: C 12 P 7/44; C 12 P 7/42; C 07 C 59/01; C 07 C 59/245  
/(C12P 7/44, C12R 1:73, 1:74, 1:84, 1:85) (C12P 7/42, C12R 1:73, 1:74, 1:84, 1:85)  
B01F 17/00, 17/56, C08G 63/06, C10M 129/44

(21) File number: P 40 15 851.9-41

(22) Date of application: 17 May 1990

(45) Date of publication of patent grant: 22 August 1991

(73) Proprietor:  
Henkel KGaA, Düsseldorf

(72) Inventors:  
Dr. Horst Eierdanz, Dr. Peter Lorenz, Dr. Franz Meussdorffer,  
Dr. Joachim Schindler, Dr. Gerhard Stoll, and Dr. Heinrich Waldhoff

(56) Reference:  
Biotechnology, Volume 6a, Chapter 9, page 329 ff, 1984, Verlag Chemie Weinheim

(54) Title:  
**PROCESS FOR PRODUCTION OF BRANCHED CARBOXYL COMPOUNDS**

### (57) ABSTRACT:

A process for transforming alkanes and/or their derivatives into dicarboxylic acids or derivatives with at least predominantly the same number of C atoms in which one works in the presence of yeast mutants whose  $\beta$ -oxidation pathway is interrupted is said be used to synthesize hydroxymonocarboxylic acids or hydroxydicarboxylic acid. This was possible by transforming 2-alkyl alkanols into hydroxymonocarboxylic acids or hydroxydicarboxylic acids.

**Description**



The invention concerns a process according to the generalizing part of Claim 1.

Dicarboxylic acids with more than 10 C atoms are difficult to synthesize by methods of preparative organic chemistry on an industrial scale. In particular this is also true for long-chained ether dicarboxylic acids which besides the two terminal carboxyl groups also display other functional groups such as double bonds or hydroxyl groups.

Therefore it has been attempted to produce dicarboxylic acids by preparative techniques from readily available raw materials with the aid of metabolic functions of various microorganisms. Thus in German patent 21 40 133 it is proposed that a yeast of the genus *Candida* or *Pichia* be allowed to act under conditions of fermentation on alkanes, primary alkanols or carboxylic acids. For example, in the case when a special strain of *Candida lipolytica* is used dicarboxylic acids are formed whose C chain is not or not significantly degraded relative to the initial material and also otherwise displays no changes such as introduction of new functional groups. Similar processes in which other special microorganisms are used are described in US patents 39 75 234 and 43 39 536; in British patent 14 05 026 and in the German preliminary published applications 21 64 626, 28 53 847, 29 37 292 and 29 51 177.

US patent 44 74 882 has unsaturated dicarboxylic acids as its subject. The latter are obtained by using a strain of the species *Candida tropicalis* for transforming unsaturated monocarboxylic acids with 14 to 22 C atoms. The unsaturated dicarboxylic acids conform in number and position of the double bond to the initial materials.

In the German preliminary published application 35 40 834 a process is reported for transforming alkanes and/or monocarboxylic acids into dicarboxylic acids in which one works with a block mutant of *Candida lipolytica*, obtaining dicarboxylic acids which display additional double bonds.

A process in which no additional double bonds are introduced is described in the German preliminary published application 37 21 119 which concerns a microorganism strain of *Candida tropicalis* which has the ability to transform, in particular, methyl myristate into tetradecanedioic

acid.

Finally German preliminary published application 37 38 812 describes a strain of *Candida tropicalis* which has the ability to transform chain-length-specifically methyl laureate into the corresponding dicarboxylic acid.

A review of literature on the entire field is found in H.J. Rehm and G. Reed (publishers), *Biotechnology*, Volume 6a, Chapter 9, pages 329ff, Verlag Chemie Weinheim 1984).

From all of the prior literature cited above, however, one cannot perceive that with the aid of yeast mutants whose  $\beta$  oxidation is blocked also branched alcohols such as 2-alkyl alkanols can be transformed into corresponding carboxylic acids, therefore hydroxymonocarboxylic acids or hydroxydicarboxylic acids. Such hydroxymonocarboxylic acids or hydroxydicarboxylic acids represent valuable raw materials. In addition the man of the art would expect that when 2-ethylalkanols are used primarily the oxidation of the  $\text{CH}_2\text{-OH}$  group in a carboxyl group would take place but not that this group would be preserved.

The invention has the objective of devising a process for obtaining these compounds by fermentation in a simple way.

The subject of the invention is therefore a process for transforming alkanes and/or their derivatives into dicarboxylic acids or derivatives with at least predominantly the same number of C atoms in the presence of yeast mutants whose  $\beta$ -oxidation pathway is interrupted, characterized by the fact that 2-alkyl alkanols are transformed into hydroxymonocarboxylic acids and/or hydroxydicarboxylic acids.

The compounds used as initial materials according to the invention are 2-alkyl alkanols. Preferred are those 2-alkyl alkanols which can be produced by dimerization and especially by the Guerbet reaction from primary linear alcohols and are industrially available. Under these conditions the dimerization products produced by the Guerbet reaction from fatty alcohols or fatty alcohol mixtures are especially preferred. Such 2-alkyl alkanols produced from fatty

alcohols may also contain double bonds.

Besides or instead of these compounds also other 2-alkyl alkanols may be used, especially products with a shorter alkyl branch in the 2-position. In this case in the process according to the invention it was learned that short-chained alkyl branches, therefore methyl or ethyl groups are not or only slightly oxidized into carboxyl groups. Longer-chained branches, however, are transformed into products with terminal carboxyl groups.

To carry out the process according to the invention the man of the art may resort to a large number of well-known yeast mutants in which the  $\beta$ -oxidation pathway is interrupted by classical mutagenesis or by genetic manipulation. Thus fundamentally a large number of mutant strains may be used which belong to the genera *Candida*, *Pichia* or *Saccharomyces*.

Mutants of the strains of *Candida lipolytica* or *Candida tropicalis* may be used with particular advantage. Thus, for example, in DE 35 40 834 A1 the strain DSM 3581 or strain DSM 4277 mentioned in DE 37 38 812 A1 or mutants or variants of these strains can be successfully and preferably used.

The fermentation medium used to carry out the process according to the invention corresponds to the media described for cultivation of *Candida* species. Suitable fermentation media contain the usual trace elements, a nitrogen source and an additional carbon source not identical to the substrate to be transformed. The term 'trace elements' here refers, for example, to the salts of the cations, ammonium, potassium, sodium, magnesium, calcium and manganese with anions such as phosphate, sulfate, and chloride. As the nitrogen source besides inorganic compounds such as  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  one may also use peptone or yeast extract.

The fermentation solution also contains a co-substrate as the carbon source. As a co-substrate for example sodium acetate may be used. It is also possible to use ordinary sugars such as glucose, fructose, maltose, trehalose and the like as the co-substrate. Glycerin is an especially preferred co-substrate.

According to another variant of the process of the invention it is preferred to add



emulsifiers to the initial compounds envisioned for transformation for better distribution in the fermentation medium. Thus favorable results are achieved if a total of 0.1-3 wt.% of emulsifiers are present relative to the fermentation medium. Suitable here are physiologically compatible emulsifiers and especially physiologically tolerable nonionic emulsifiers. Thus, for example, sugar esters or sorbitan esters, ethoxylated sugar esters, ethoxylated sorbitan esters or also alkyl glycosides may be used.

The hydroxycarboxylic acids or hydroxydicarboxylic acids produced according to the invention may be used as initial materials for the production of polyesters or in the lubricant sector.

## Examples

### Medium A

"Yeast nitrogen base" Medium, pH 6.8, supplemented with 1.3% glucose, 4.5% glycerin, 0.3% Na acetate, 0.3% peptone and 0.6% yeast extract and 0.5% transformation educt.

### Medium B

0.2 M phosphate buffer, pH 7.8 with "yeast nitrogen base w/o amino acids", 0.3% ethoxylated sorbitan ester, MYRJ52<sup>®</sup> and 3% substrate.

### Example 1

*Candida lipolytica* DSM 3581 was inoculated in 100 ml of YM nutrient bouillon (500 ml Erlenmeyer flasks with baffles) and shaken for 36 h at 140 rpm. From this pre-culture an aliquot (10 ml) was used to inoculate 100 ml of medium A. This culture was shaken for 36 h at 30EC. Then 50 ml of the cell suspension obtained was transferred with 50 ml of medium B to new sterile 500 ml Erlenmeyer flasks and shaken at 30EC. As the substrates either 2-octyldodecanol (Eutanol<sup>□</sup>G20) or 2-hexyldecanol (Eutanol<sup>®</sup>G16) were used. After 6 h a first pH

check was performed, and at the same time an additional 3% of the educt and 1% glycerin were added as co-substrate.

The formation of products was monitored by TLC. By staining with 2,7-dichloro-fluorescein and  $\text{FeCl}_3$  compounds which contain carboxyl groups (including carboxylic acids, i.e. products) could be visualized selectively.

### Example 2

A preculture of a mutant of *Candida tropicalis* DSM 4277 -- as described in example 1 -- was cultured and used to inoculate 500 ml of medium A in 2 liter Erlenmeyer flasks. The culture was shaken at 48 h at 30EC (140 rpm) and subsequently centrifuged off sterile in 100 ml aliquots. The cells were suspended in 100 ml of medium B (500 ml Erlenmeyer flask) using 2-octyl dodecanol (Eutanol® G20) as the substrate. After 24 h in each case the pH of the batch was checked and adjusted if necessary, and the progress of the transformation was checked by TLC with subsequent staining for carboxyl groups. The appearance of positive bands after staining with iron chloride indicated the formation of carboxylic acid. After 60, 80 and 161 h acetic ester extracts of aliquots of the batch were studied by HPLC for their composition. Newly formed compounds were characterized after separation and derivatization by GCMS. It could therefore be shown that after 64 h 0.8 g/l of monohydroxy acids and 0.8 g/l of hydroxydicarboxylic acid had formed.

### Example 3

*Candida tropicalis* (from example 2) was used in the same manner as in example 2 for transformation of Lial® 123. The analysis of the product was performed as described in example 2 by TLC, HPLC and GCMS. After 48 h 0.4 g/l of  $\text{C}_{13}$  hydroxymonocarboxylic acid had formed.

### Claims

1. Process for transforming alkanes and/or their derivatives into dicarboxylic acids or

derivatives with at least predominantly the same number of C atoms in the presence of yeast mutants whose  $\beta$ -oxidation pathway is interrupted, characterized by the fact that 2-alkyl alkanols are transformed into hydroxymonocarboxylic acids and/or hydroxydicarboxylic acids.

2. Process as in claim 1 characterized by the fact that dimerization products produced by the Guerbet reaction of linear primary alcohols with 12 to 40 C atoms are used.

3. Process as in one of claims 1 and 2 characterized by the fact that dimerization products of saturated or unsaturated fatty alcohols produced by the Guerbet reaction are used.

4. Process as in one of claims 1-3 characterized by the fact that 2-alkyl alkanols with 12-40 C atoms are used.

5. Process as in one of claims 1-4 characterized by the fact that one works in the presence of a mutant of a strain from the genera *Candida*, *Pichia* or *Saccharomyces* in which the  $\beta$ -oxidation pathway has been interrupted by classical mutagenesis or by genetic engineering manipulation.

6. Process as in one of claims 1-5 characterized by the fact that one works in the presence of a mutant of *Candida lipolytica* or *Candida tropicalis*.